

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 19.11.19.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.05.21 Bulletin 21/20.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : SMARTCATCH Société par actions
simplifiée (SAS) — FR.

72 Inventeur(s) : JIMENEZ-ZENTENO Alejandro
Kayum, BOURRIER David, BOU Elise, CERF Aline,
AUBERT Hervé, VIEU Christophe et MALAVAUD Ber-
nard.

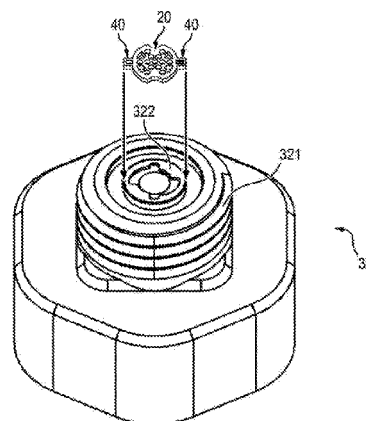
73 Titulaire(s) : SMARTCATCH Société par actions sim-
plifiée (SAS).

74 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54 Système de capture et de détection d'espèces présentes dans un fluide biologique.

57 L'invention concerne un système de détection d'au
moins une espèce présente dans un fluide de préférence
d'au moins une cellule circulante ou d'agrégat de cellules
présent(e)(s) dans un fluide biologique humain ou animal et
notamment de cellules tumorales circulantes (CTC) pré-
sentes dans un fluide sanguin, le système de détection com-
prenant des moyens de filtration (20) dudit fluide, lesdits
moyens de filtration (20) comprenant une membrane fil-
trante (21), ladite membrane filtrante comprenant au moins
un pore (22) adapté pour retenir une espèce d'un type don-
né présente dans le fluide, lesdits moyens de filtration (20)
comportant en outre au moins une ouverture (23) adaptée
pour assurer, en fonctionnement au sein du fluide, une
continuité de circulation du fluide biologique même lorsque
ledit au moins un pore (22) est occupé.

Figure pour l'abrégé : FIGURE 11a



Description

Titre de l'invention : Système de capture et de détection d'espèces présentes dans un fluide biologique

[0001] DOMAINE TECHNIQUE GENERAL

[0002] L'invention concerne le domaine de la capture d'espèces spécifiques ou de particules présents dans un fluide biologique ou non (sang et ses dérivés tels que le plasma et le sérum, urine, eau, air, et tout fluide nécessitant analyse). L'invention concerne notamment la capture de cellules d'intérêts présentes dans un fluide biologique tel que le sang afin d'analyser ces cellules pour effectuer un suivi médical. L'invention trouve notamment application dans la détection de cellules tumorales circulantes pour le suivi médical d'un patient atteint d'une pathologie cancéreuse et/ou l'extraction quasi-complète des cellules tumorales contenues dans le sang.

ETAT DE LA TECHNIQUE

[0003] Un fluide peut être porteur de plusieurs types d'espèces ou billes dont l'énumération et l'analyse présentent un intérêt. En particulier, les fluides biologiques animaux ou humains sont porteurs de plusieurs types de cellules dont la présence peut permettre de suivre ou détecter différentes pathologies.

[0004] En particulier, les cellules tumorales circulantes (CTCs ci-après) dans le sang circulant sont étudiées pour permettre de diagnostiquer des cancers et ainsi permettre une meilleure prise en charge des patients.

[0005] En effet les tumeurs cancéreuses libèrent dans la circulation sanguine des CTCs et il est démontré que ce phénomène apparaît à un stade précoce de la maladie. L'analyse biologique et moléculaire d'un ou plusieurs cellule(s) permet de porter un diagnostic précis et d'apporter des informations notamment sur l'agressivité du cancer et l'efficacité d'un traitement. Les CTCs représentent donc un biomarqueur d'intérêt à tous les temps de la prise en charge de la maladie cancéreuse, diagnostic, pronostic et surveillance.

[0006] Or les CTCs sont présentes en concentration extrêmement faible dans le sang des patients atteints de cancer (environ $1/10^9$ cellules sanguines normales). L'isolation et/ou l'extraction quasi-complète de ces cellules rares est donc extrêmement difficile.

[0007] On connaît différents procédés *in vitro* pour procéder à cette isolation basés sur une immunodétection. Ils se fondent sur la présence à la surface des CTCs d'EpCAM (en anglais, « epithelial cell adhesion molecule »), un antigène membranaire spécifique des cellules d'origine épithéliale. Un échantillon de 7,5 ml de sang est centrifugé, puis mis en présence de nanoparticules ferromagnétiques munies à leur surface d'anticorps anti-EpCAM. Les CTCs sont alors séparées des autres cellules par application d'un champ

magnétique. L'inconvénient de ce système est double :

- [0008] - il utilise un échantillon de sang très limité (7,5 ml ce qui correspond à 0.15 % du volume sanguin total), dans lequel le nombre de CTCs, compte tenu de leur faible concentration, est très faible ;
- [0009] - il ne permet pas de détecter les CTCs ayant perdu la protéine EpCAM lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) ce qui représente environ 2/3 de la population totale de ces cellules ; d'autre part, il ne permet la détection que de cellules différenciées dont la durée de vie est limitée et qui ne sont pas les plus dangereuses.
- [0010] On connaît d'autres approches pour isoler les CTCs *in vitro* à partir d'un échantillon sanguin, basées sur la taille des CTCs. En particulier, le système ISET (« Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells ») utilise la filtration d'un échantillon de sang traité (lyse des globules rouges préalable) sur une membrane en polycarbonate micro perforée ; dans ce système, les CTCs sont préalablement rigidifiées par application de paraformaldéhyde de façon à résister à la forte pression qui est appliquée.
- [0011] De façon générale, la sensibilité de la détection *in vitro* est réduite du fait du faible volume des échantillons. En effet, étant donné la rareté des CTCs dans le sang, leur présence dans un échantillon de quelques millilitres peut se chiffrer à quelques unités à un stade déjà avancé du cancer. Leur détection à des stades beaucoup plus précoces est de fait quasi-impossible.
- [0012] Plus récemment des systèmes conçus pour être utilisés *in vivo* ou par aphérèse ont été développés afin d'effectuer la capture des CTCs dans le milieu physiologique, ce qui permet de préserver au mieux leur viabilité et de potentiellement accéder à des volumes sanguins plus importants que ceux analysés par les systèmes *in vitro*.
- [0013] Bien que les systèmes soient plus avantageux que les systèmes *in vitro*, aucun des systèmes ne permet la capture et la numération simultanée des CTCs notamment pour une utilisation en temps réel.
- [0014] En effet les systèmes connus mettent en œuvre des techniques d'immunomarquage des cellules capturées pour identifier leur nature tumorale. Ces techniques requièrent de la manipulation post-capture, sont coûteuses et ne permettent pas une détection directe en temps réel au chevet du patient. Les plateformes ainsi utilisées doivent en outre être transparentes pour permettre l'utilisation d'un microscope à fluorescence et comptabiliser les cellules capturées. De plus ces techniques ne permettent pas de garantir l'intégrité des cellules marquées qui sont altérées avant les analyses biologiques ou leur mise en culture.

PRESENTATION DE L'INVENTION

- [0015] L'invention propose un système qui pallie les inconvénients des techniques antérieures.

- [0016] A cet effet, l'invention propose, selon un premier aspect, un système de détection d'au moins une espèce présente dans un fluide de préférence d'au moins une cellule circulante ou d'agrégat de cellules présent(e)(s) dans un fluide biologique humain ou animal et notamment de cellules tumorales circulantes présentes dans un fluide sanguin, le système de détection comprenant des moyens de filtration dudit fluide, lesdits moyens de filtration comprenant une membrane filtrante, ladite membrane filtrante comprenant au moins un pore adapté pour retenir une espèce d'un type donné présente dans le fluide, lesdits moyens de filtration comprenant en outre au moins une ouverture adaptée pour assurer, en fonctionnement au sein du fluide, une continuité de circulation du fluide biologique même lorsque ledit au moins un pore est occupé.
- [0017] L'invention selon le premier aspect est avantageusement complétée par les caractéristiques suivantes, prises seules ou en une quelconque de leur combinaison techniquement possible :
- [0018] - le système comprend une pluralité d'électrodes disposées autour dudit au moins un pore, lesdites électrodes formant un ou plusieurs circuits électriques dont les impédances sont aptes à varier dès lors que du ou des cellules se logent dans ou à proximité d'un pore ;
- [0019] - le système comprend en outre une inductance connectée aux électrodes de manière à former un circuit résonateur électromagnétique, les électrodes et l'inductance formant un circuit de détection, de préférence interrogeable à distance, de la présence de cellules piégées ;
- [0020] - la membrane filtrante est en matériau choisi du groupe comprenant du verre ou du métal (Nickel, Or) ou polymère, matériau ferromagnétique, matériau magnétique (NiFe), ou la combinaison de verre et de Silicium ou de Nickel et de Silicium, Nitrure de Silicium, Silicium ou plus généralement d'un matériau biocompatible et non toxique ;
- [0021] - les pores présentent une dimension transversale comprise entre 0,1 μm et 100 μm , de préférence entre 8 μm et 12 μm ou entre 8 μm et 15 μm ; et/ou les pores sont espacés d'un intervalle compris entre 100 nm et 100 μm ; le nombre de pores est compris entre 100 et 100 000 000 ;
- [0022] - les pores sont sensiblement circulaire ou sensiblement ovale ou sensiblement polygonale ou prennent la forme d'une fente ;
- [0023] - les pores de la membrane sont arrangés par groupe de plusieurs pores, chaque groupe présentant un motif, les groupes pouvant être reliés entre eux via une rangée de pores ;
- [0024] - le motif formé par un groupe présente une forme : hexagonale, circulaire ;
- [0025] - la membrane comprend plusieurs groupes de pores arrangés selon une structure en carré ou en forme d'étoile ;

- [0026] - les pores de la membrane sont arrangés de manière aléatoire ;
- [0027] - les moyens de filtration comprennent un support plan comprenant une zone évidée où se situe la membrane filtrante et dans lequel ladite ouverture est formée, ladite ouverture étant disposée en périphérie de la membrane filtrante ;
- [0028] L'invention selon le deuxième aspect propose un ensemble de capture comprenant une pluralité de systèmes selon l'invention disposés en série, chaque système comprenant des moyens de filtration adaptés pour retenir un type d'espèce.
- [0029] L'invention selon le deuxième aspect est avantageusement complétée par les caractéristiques suivantes, prises seules ou en une quelconque de leur combinaison techniquement possible :
- [0030] - l'ensemble comprend un module d'entrée, un module de sortie, et au moins un module intermédiaire disposé entre le module d'entrée et le module de sortie, le module intermédiaire et le module de sortie supportant des moyens de filtration, les dits modules comprenant des moyens de fixation entre eux ;
- [0031] - le module d'entrée comprend une entrée du fluide et le module de sortie comprend une sortie du fluide.
- [0032] La capture de différentes espèces se base sur les propriétés physiques des espèces circulant dans un fluide et notamment sur leur taille et leur déformabilité. Dans le cas de cellules le fluide est biologique (sang, urine, lymphé et de manière plus générale tout fluide circulant dans un être humain ou un animal et portant des cellules ayant un intérêt à être analysées).
- [0033] S'agissant de cellules potentiellement présentes dans le sang, les plaquettes ont une dimension de 2 à 4 μm et les globules rouges une dimension d'environ 7 μm ; les globules blancs ont des dimensions variables de 7 à 15 μm mais ils sont très déformables. Les CTCs ont des dimensions variables, comprises entre 4 et 25 μm mais elles sont peu déformables. De ce fait, dès lors que les cellules sont peu déformables, elles peuvent être capturées par les moyens de filtration tout en laissant passer les autres composants non tumoraux du fluide biologique dans des conditions normales de l'écoulement sanguin tel qu'il existe in vivo.
- [0034] La présence des ouvertures permet d'assurer une continuité de circulation du fluide biologique dans les conditions in vivo de pression et de vitesse et ce quel que soit le remplissage de la membrane filtrante par les éléments capturés.
- [0035] De manière préférée, en couplant la membrane filtrante et ses orifices à des électrodes, l'invention combine la capture physique à la détection des cellules piégées au voisinage des pores. Ainsi, la numération des cellules capturées peut être effectuée en temps réel.
- [0036] En particulier, lorsqu'il s'agit de CTCs ces dernières ayant des propriétés diélectriques spécifiques, elles influent sur l'impédance du circuit électrique formé par

les électrodes. Elles influent en temps réel sur un signal électrique et permettent donc une détection en temps réel des cellules capturées par le moyen de filtration ou du taux d'obstruction des moyens de filtration. La détection du taux d'obstruction permet de déterminer si les moyens de filtration peuvent permettre la capture d'espèces sans être saturés.

[0037] Partant du constat que les CTCs présentent des propriétés diélectriques différentes des autres cellules qui pourraient être piégées, il est possible de les discriminer parmi les cellules capturées.

[0038] La détection électrique en temps réel des CTCs basée sur leurs propriétés diélectriques permet de s'affranchir des étapes de marquage immunologique des cellules tumorales et de la mise en place d'un système compatible avec la microscopie optique nécessaire pour la caractérisation des cellules marquées. Ainsi, l'invention permet de caractériser directement la présence de CTCs sur la membrane filtrante en évitant la manipulation ultérieure du dispositif. L'information médicale est donc délivrée instantanément, à moindre coût et de façon non invasive. Le suivi en temps réel de la capture présente un avantage important pour les utilisations in vivo et ex vivo en permettant à l'utilisateur d'ajuster le temps d'exposition du dispositif au fluide sanguin et à la charge tumorale du patient analysé, afin de personnaliser le temps d'exposition du dispositif en fonction de la richesse ou de la rareté de l'information du dispositif et donc la précision de l'information médicale fournie. En outre, l'invention permet également de retirer, après capture, les cellules tumorales circulantes contenues dans le sang offrant une modalité thérapeutique.

[0039] Grâce à l'invention, on offre au clinicien une information initiale immédiate sur le nombre d'espèces par unité de temps ou de volume exposé qui sera ensuite complétée par l'analyse de la population ainsi capturée. Soulignons que de nombreuses méthodes analytiques demandent une prise d'essai minimale et que l'invention permet aussi de s'assurer que les conditions de réalisations des analyses sont bien remplies avant d'engager des dépenses souvent coûteuses. En outre, on s'affranchit de toute étape de recueil, d'acheminement et de préparation de l'échantillon. La qualité de l'information est préservée, les cellules sont isolées en conditions natives et physiologiques, et cette information est restituée sur-le-champ au spécialiste, au sein-même du lieu de consultation, pour une prise de décision immédiate. L'invention permet en outre de générer des données utiles à la prise en charge du patient. Les conditions de fluide sanguin variant d'un patient à l'autre et à l'échelle du patient lui-même tout au long de la journée, cette invention peut être couplée à une mesure de vitesse de fluide locale qui servira de calibration ou de référence pour constituer une base de données comparables.

[0040] Avantageusement, grâce au couplage du circuit électrique formé par les électrodes à

un circuit résonateur, les variations d'impédance liées à la détection des CTCs peuvent être mesurées à distance et sans contact dans un mode sans fil (en anglais, « *remote wireless* »).

[0041] Également, une fonctionnalisation de la surface du système avec des anticorps est envisageable et permet d'associer capture physique et capture par affinité.

PRESENTATION DES FIGURES

[0042] D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention ressortiront de la description qui suit, qui est purement illustrative et non limitative, et qui doit être lue en regard des dessins annexés sur lesquels :

[0043] [fig.1] la figure 1 illustre un système de capture d'espèces présentes dans un fluide ;

[0044] [fig.2] la figure 2 illustre une membrane filtrante selon un mode de réalisation de l'invention ;

[0045] [fig.3] la figure 3 un schéma plus détaillé de la membrane de la figure 2 ;

[0046] [fig.4]

[0047] [fig.5]

[0048] [fig.6] les figures 4, 5 et 6 illustrent un schéma des membranes filtrantes selon différents modes de réalisation ;

[0049] [fig.7] la figure 7 illustre deux modes de réalisation pour l'agencement des électrodes autour des orifices des membranes filtrantes selon l'invention ;

[0050] [fig.8] la figure 8 illustre un compartiment du système de l'invention ;

[0051] [fig.9a]

[0052] [fig.9b]

[0053] [fig.9c]

[0054] [fig.9d]

[0055] [fig.9e] les figures 9a, 9b, 9c, 9d, 9e illustrent différentes vues d'un module d'entrée d'un compartiment du système de l'invention ;

[0056] [fig.10a]

[0057] [fig.10b]

[0058] [fig.10c]

[0059] [fig.10d]

[0060] [fig.10e]

[0061] [fig.10f] les figures 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f illustrent différentes vues d'un module de sortie d'un compartiment du système de l'invention ;

[0062] [fig.11a]

[0063] [fig.11b] les figures 11a, 11b illustrent la fixation d'un système de capture dans un module du compartiment du système selon l'invention ;

[0064] [fig.12a]

- [0065] [fig.12b]
- [0066] [fig.12c] les figures 12a, 12b et 12c illustrent le compartiment de la figure 8 avec en plus un module intermédiaire ;
- [0067] [fig.13a]
- [0068] [fig.13b]
- [0069] [fig.13c]
- [0070] [fig.13d]
- [0071] [fig.13e]
- [0072] [fig.13f] les figures 13a, 13b, 13c, 13d, 13e, 13f illustrent différentes vues d'un module intermédiaire d'un compartiment du système de l'invention.
- [0073] Sur l'ensemble des figures les éléments similaires portent des références identiques.

DESCRIPTION DETAILLEE

- [0074] On décrit ci-après un mode de réalisation de l'invention dans le cadre de la capture et de la détection de cellules présentes dans un fluide biologique mais l'invention s'applique à la capture et à la détection de tous types d'espèces ou de billes présentes dans un fluide biologique ou non (sang et ses dérivés tels que le plasma et le sérum, urine, eau, air, polluant, etc.).
- [0075] On précise que l'invention s'applique à la capture d'espèces et qu'on entend par espèce : une cellule tumorale ; un agrégat de cellules tumorales ; un caillot de sang (le fluide étant alors du sang) ; un exosome.
- [0076] En relation avec la **figure 1**, un système 1 de capture de cellules circulantes présentes dans un fluide comprend une entrée 11 de fluide et une sortie 12 de fluide.
- [0077] Un tel système 1 peut être relié à la circulation sanguine d'un humain via son bras 100 mais il peut bien entendu être également relié à une autre partie du corps humain ou d'un animal. Alternativement, un tel système 1 peut être relié d'une part à une éprouvette 101 contenant un fluide et d'autre part à un système 102 de récupération du fluide après passage dans le système 1 de capture.
- [0078] Dans le cas d'une utilisation ex vivo ou in vitro une pompe péristaltique 13 est reliée à l'entrée du fluide, un capteur 14 de débit permet de régler la pompe 13. La pompe 13 permet d'amener le fluide aux moyens de filtration 20 qui vont être décrits ci-après en détail. Ainsi, le fluide entrant passe au travers des moyens de filtration 20 et sont ré-injectés dans le corps du patient ou de l'animal ou bien dans un tube de récupération du fluide.
- [0079] L'entrée de fluide et la sortie de fluide sont reliées au fluide circulant par des cathéters ou par tout autre moyen connu de l'homme du métier et adaptés à l'endroit où le système doit être utilisé.
- [0080] Alternativement, le système peut être utilisé in vivo et ne nécessite pas de pompe. Il

est dans ce cas placé directement au sein du fluide en circulation.

- [0081] Les moyens de filtration 20 sont avantageusement couplés à des moyens de détection 26 des cellules capturées.
- [0082] Une unité de mesure 15 en liaison avec les moyens de détection 26 permet de mesurer des informations relatives aux cellules détectées.
- [0083] Le système 1 comprend également une interface de communication 16 filaire ou sans fil en communication avec un terminal 2 filaire ou sans fil. Un tel terminal 2 comprend des interfaces permettant à un utilisateur d'accéder à diverses informations relatives à la détection.
- [0084] *Moyens de filtration*
- [0085] Les **figures 2 et 3** illustre une réalisation possible des moyens de filtration 20. Ces moyens de filtration monolithiques comprennent un support plan 24 par exemple de forme circulaire comprenant une zone 25 dans laquelle se situe une membrane 21 filtrante.
- [0086] La membrane est par exemple de forme circulaire et se situe dans une zone 25 de la même forme.
- [0087] Dans la membrane sont formés au moins un pore 22 permettant de capturer/retenir des cellules présentes dans le fluide biologique dans lequel sont placés les moyens de filtration 20.
- [0088] La membrane est constituée d'un matériau biocompatible et non toxique choisi du groupe comprenant du verre ou du métal (Nickel, Or), ou polymère, matériau ferromagnétique, matériau magnétique (NiFe), multi-matériaux (Verre/Silicium), Nitrure de Silicium, Silicium.
- [0089] Bien entendu pour des applications où le fluide n'est pas biologique le fait que le matériau soit biocompatible est sans importance.
- [0090] Les pores présentent avantageusement une dimension transversale comprise entre 0,1 μm et 100 μm , de préférence entre 8 μm et 12 μm ou entre 8 μm et 15 μm et sont typiquement en nombre compris entre 1000 et 6000, de préférence entre 100 et 100 000. La taille et le nombre de pores dépend du type de cellule circulante à capturer et de la manière d'utiliser les moyens de filtration (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*).
- [0091] De manière complémentaire, les pores sont espacés d'un intervalle compris entre 0,1 μm et 100 μm , de préférence entre 8 μm et 12 μm ou entre 8 μm et 15 μm
- [0092] Les pores sont de diverses formes. Ils peuvent être sensiblement circulaires ou sensiblement ovales ou sensiblement polygonaux ou peuvent prendre la forme d'une fente.
- [0093] De manière avantageuse, les pores de la membrane sont arrangés par groupe de plusieurs pores, chaque groupe présentant un motif, les groupes pouvant être reliés entre eux par l'intermédiaire d'une rangée de pores.
- [0094] Par exemple, sur la figure 2, les pores sont arrangés selon quatre groupes 210, chaque

groupe présentant une forme polygonale.

- [0095] Les groupes peuvent être disposés sur la membrane selon plusieurs motifs : en carré (figure 2) ou en étoile (**figure 4**). Pour la structure en forme d'étoile les pores sont arrangés en groupes 211 de forme hexagonale, les groupes 211 de forme hexagonale sont reliés entre eux par des groupes 212 de pores en forme de fente. Ainsi, la structure en étoile est obtenue par la combinaison de deux regroupements de pores. La structure en étoile s'étend depuis un groupe 211 central disposé au centre la membrane et six branches s'étendent depuis ce groupe central. Sur chaque branche, deux groupes de forme polygonale sont reliés au groupe central, des fentes 212 connectent les groupes de forme polygonale. Le nombre de branches peut évidemment varier tout comme le nombre de groupes par branche.
- [0096] Afin de permettre une continuité dans la circulation du fluide, des ouvertures 23 sont formées dans le support en périphérie des pores. Afin de maintenir un écoulement sanguin non perturbé et ce quel que soit le degré d'occultation des zones filtrantes par les éléments capturés.
- [0097] En faisant à nouveau référence aux figures 2 et 3, les ouvertures sont en forme de secteur angulaire autour de la membrane. Une telle forme n'est pas limitative et d'autres formes peuvent être envisagées. Également, des éléments perturbateurs du fluide ou de concentration du fluide peuvent être disposés.
- [0098] Le nombre et la forme des ouvertures sont optimisés pour altérer le moins possible la tenue mécanique des moyens de filtration 20. Sur les exemples illustrés sur les figures 2 et 3, quatre ouvertures 23 sont présentes tandis que sur l'exemple de la **figure 5**, six ouvertures 23 sont présentes.
- [0099] De manière alternative et en relation avec la **figure 6**, la membrane peut comprendre outre, les ouvertures 23 périphériques en forme de secteur angulaire, une ouverture centrale 27. Dans cet exemple, les pores sont par groupes de forme polygonale reliés deux à deux par des groupes en forme de fente. Les ensembles de deux groupes hexagonaux sont répartis en forme d'étoile autour de l'ouverture centrale 24.
- [0100] Pour la configuration de la figure 4 on peut avoir les paramètres suivants :
- [0101] - Diamètre pores circulaires 8 μm , 9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm ;
- [0102] - Distance inter-pores de 5 μm ;
- [0103] - Nombre de pores : 4246, 3395, 2717, 2287, 1880 ;
- [0104] - Nombre moyen de pores par groupe hexagonal : 271, 220, 169, 135, 121 ;
- [0105] - Nombre moyen de pores par fente : 54, 45, 40, 27 ;
- [0106] - Surface occupée par les pores : 0,213 mm^2 , 0,216 mm^2 , 0,217 mm^2 ;
- [0107] - Surface d'une ouverture : 0,111 mm^2 ;
- [0108] - Surface totale occupée par les quatre ouvertures : 0, 444 mm^2 .
- [0109] Pour la configuration de la figure 5, on peut avoir les paramètres suivants :

- [0110] - Diamètre pores circulaires 8 μm , 9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm ;
- [0111] - Distance inter-orifices de 5 μm ;
- [0112] - Nombre de pores : 3395, 4246, 2717, 2287, 1880 ;
- [0113] - Nombre moyen de pores par groupe hexagonal : 220, 271, 121, 169, 135 ;
- [0114] - Nombre moyen de pores par fente : 45, 54, 40, 27, 54 ;
- [0115] - Surface occupée par les pores : 0,216 mm^2 , 0,213 mm^2 , 0,217 mm^2 ;
- [0116] - Surface d'une ouverture : 0,111 mm^2
- [0117] - Surface totale occupée par les six ouvertures : 0,666 mm^2 .
- [0118] Pour la configuration de la figure 6, on peut avoir les paramètres suivants :
- [0119] - Diamètre pores 8 μm , 9 μm , 10 μm , 11 μm , 12 μm ;
- [0120] - Distance inter-pores de 5 μm ;
- [0121] - Nombre de pores : 1227, 486, 386, 324, 271 ;
- [0122] - Nombre moyen de pores par groupe hexagonal : 220, 169, 135, 121 ;
- [0123] - Nombre moyen de pores par fente : 45, 40, 27 ;
- [0124] - Surface occupée par les pores : 0,213 mm^2 , 0,216 mm^2 , 0,217 mm^2 ;
- [0125] - Surface occupée par l'ouverture centrale : 0,057 mm^2 ;
- [0126] - Surface d'une ouverture périphérique : 0,111 mm^2 ;
- [0127] - Surface totale occupée par les six ouvertures et l'ouverture centrale : 0,723 mm^2 .
- [0128] *Electrodes de détection et unité de mesure*
- [0129] En relation avec les **figures 3 et 7** et afin de détecter les cellules capturées par les moyens de filtration 20, le système de capture et de détection comprend avantageusement des moyens de détection 26 constitués par des électrodes disposées autour des pores 22. Les électrodes 26 sont connectées entre elles afin de former un ou plusieurs circuits électriques caractérisés par une impédance dont la valeur dépend de la fréquence et de l'amplitude de l'excitation électrique. La valeur de cette impédance en fonction de la fréquence est influencée par la présence de cellules au voisinage des électrodes contournant les pores 22.
- [0130] En particulier, s'agissant de CTCs possédant des propriétés diélectriques spécifiques, elles font varier la valeur de cette impédance de manière discernable des autres types cellulaires potentiellement piégés. Selon la variation détectée, il est possible de détecter les cellules capturées et leur type. Les électrodes sont par exemple en or, en cuivre, en platine, nickel, matériaux piézoélectriques, polymère conducteur. L'impédance est mesurée sur une gamme variant de 10 Hz à 1MHz voire 5 MHz.
- [0131] Ces électrodes entourent donc les pores de la membrane filtrante de manière à sonder électriquement les propriétés diélectriques du milieu au voisinage des pores où les cellules capturées se trouvent piégées.
- [0132] Comme illustré sur la figure 7, les électrodes peuvent entourer de diverses manières les pores : en enveloppant les pores ou bien en formant des pistes droites autour des

pores. Le choix de la forme des électrodes dépend de la densité des pores. De manière alternative, les électrodes peuvent se situer sur des parois internes des pores.

- [0133] Des pistes 29 de connexion reliant les électrodes à des plots 28 de contact sont nécessaires pour effectuer des mesures directes (actives). Les plots 28 sont connectés à une unité de mesure 15 qui permet de mesurer directement la valeur des variations d'impédance induites par la présence des cellules entre les électrodes.
- [0134] L'unité de mesure peut comprendre une bobine 151 connectée aux électrodes de façon à former un résonateur électromagnétique pour effectuer des mesures passives et sans fil (interrogation du dispositif et réception du signal à distance). Un terminal 2 sans fil permet alors de mesurer sans contact la variation de l'impédance des circuits de détection. La bobine 151 peut aussi être incluse dans la membrane, la valeur de son inductance pouvant alors être mesurée à distance.
- [0135] Encore alternativement, une liaison filaire entre les électrodes et l'unité de mesure 15 est possible et permet directement de lire la valeur des impédances des circuits de détection. Le terminal 2 peut aussi se connecter de manière filaire à l'unité de mesure 15.
- [0136] Quelle que soit la manière de mesurer la variation d'impédance, cette mesure est directe et est en temps réel. Elle permet donc de déterminer la présence de cellules sur la surface de la membrane. Cette variation d'impédance induite par la présence de cellules au voisinage des pores de capture dépend de la nature des cellules piégées, sa mesure permet donc de discerner parmi toutes les cellules piégées lesquelles sont tumorales. Cette mesure est non invasive pour les cellules à détecter et n'affecte en aucun cas leur viabilité.
- [0137] *Compartiment*
- [0138] Comme illustré sur la **figure 8**, le système de capture et de détection comprend avantageusement un compartiment 30 dans lequel sont logés les moyens de filtration 20. Ce compartiment comprend un module d'entrée 31 formant une partie femelle et un module de sortie 32 formant une partie mâle 32. Ainsi, le module d'entrée et le module de sortie peuvent être assemblés en les vissant ensemble ou bien en les emboitant.
- [0139] Le module d'entrée 31 est visible sur les **figures 9a, 9b, 9c, 9d et 9e** et module de sortie 32 est visible sur les **figures 10a, 10b, 10c, 10d, 10e et 10f**.
- [0140] Le module d'entrée 31 comprend un logement 311 formant la partie femelle 310 pour recevoir la partie mâle 321 du module de sortie 32. Si les modules d'entrée 31 et de sortie 32 sont vissés, alors la partie femelle est taraudée tandis que la partie mâle est filetée.
- [0141] Pour amener le fluide dans le compartiment, le module d'entrée 31 comprend une tige creuse 312 prolongée par un cône 313. La tige creuse 312 et le cône 313 sont reliés à la partie femelle 310 et permettent d'amener le fluide depuis l'orifice 314 d'entrée du

module d'entrée 31. L'orifice 314 d'entrée présente une forme adaptée pour être relié à un canal permettant d'amener le fluide à analyser. La partie femelle 310 présente la forme d'un cylindre creux connecté au cône 313. La forme conique permet d'avoir au niveau du module d'entrée une grande quantité de flux.

[0142] La partie mâle 321 du module de sortie 32 comprend un emplacement 322 configuré pour recevoir les moyens de filtration 20. Cet emplacement 322 présente une forme adaptée à la forme des moyens de filtration 20 qui comprennent à ce titre des pattes 40 (voir la figure 2) permettant leur insertion et leur maintien dans l'emplacement 322. Les moyens de filtration 20 s'insèrent dans l'emplacement 322 en introduisant les pattes dans logements 323 complémentaires prévus au niveau de l'emplacement 322 puis en appliquant une rotation aux moyens de filtration 20 ces derniers sont mis en place pour rester immobile. L'emplacement 322 comprend des gorges 324 permettant l'insertion des pattes pour bloquer les moyens de filtration après rotation. Ces gorges sont usinées de part et d'autre des logements 323 recevant les pattes 40 des moyens de filtration 20. Des contacts électriques peuvent être prévus dans les gorges. Les **figures 11a et 11b** illustrent les moyens de filtration 20 agencés dans l'emplacement 322.

[0143] Pour permettre la sortie du fluide après passage dans les moyens de filtration 20, le module de sortie 32 comprend une tige creuse 325 connectée à un cylindre creux 320. Le cylindre creux 320 est entre la partie mâle 321 et la tige creuse 320. La tige creuse 325 présente un orifice de sortie 326 adapté pour être relié à un canal permettant d'évacuer le fluide après analyse.

[0144] Lorsque les modules d'entrée et de sortie sont assemblés, les moyens de filtration sont à l'intérieur du compartiment et ne sont pas visibles de l'extérieur.

[0145] Le compartiment présente l'avantage de pouvoir être facilement démonté pour pouvoir remplacer les moyens de filtration au besoin.

[0146] Lorsque les moyens de filtration sont agencés dans le compartiment on obtient un ensemble monobloc.

[0147] Le compartiment est en matériau de préférence biocompatible notamment lorsqu'il est destiné à être utilisé *in vivo*.

[0148] *Mise en série de plusieurs moyens de filtration*

[0149] Selon un mode de réalisation de l'invention, comme illustré sur les **figures 12a, 12b et 12c**, les moyens de filtration peuvent être mis en série. Ainsi, il y a plusieurs membranes filtrantes en série chacune ayant des caractéristiques propres à la capture d'un type de cellule. Alternativement, la membrane peut être définie pour capturer plusieurs types de cellules. Dans ce cas, la membrane comprend des pores de différentes tailles et formes.

[0150] La mise en série consiste à assembler plusieurs modules entre eux.

[0151] Sur la figure 12a de gauche à droite on a donc un module d'entrée 31 comme décrit

ci-avant, un ou plusieurs module(s) intermédiaire(s) 33 et un module de sortie 32 comme décrit également ci-avant.

[0152] Le module intermédiaire est visible sur les **figures 13a, 13b, 13c, 13d, 13e et 13f**.

[0153] Comme on peut le voir sur ces figures, le module intermédiaire comprend une partie mâle 331 et une partie femelle 330. Le module intermédiaire 33 peut être vissé ou emboîté dans/avec respectivement la partie femelle du module d'entrée 31 et la partie mâle du module de sortie 32. Dans le cas où le module intermédiaire 33 est vissé, il comprend une partie mâle filetée et une partie femelle taraudée.

[0154] La partie mâle 331 comprend un emplacement 332 pour recevoir des moyens de filtration 20. L'emplacement 332 présente les mêmes formes et caractéristiques que celui du module de sortie 32 précédemment décrit.

[0155] En résumé, le module intermédiaire 33 diffère essentiellement du module de sortie en ce qu'il ne comprend pas de tige pour la sortie du fluide.

[0156] Grâce à la mise en place d'un ou plusieurs module(s) intermédiaire(s) il est donc possible d'avoir en série plusieurs moyens de filtration pour ainsi capturer et détecter plusieurs types de cellules.

[0157] Également, on peut prévoir des modules qui permettent de modifier le fluide en fonction des besoins. Par exemple, un module peut concentrer le fluide avant d'être filtré par les moyens de filtration.

[0158] On obtient ainsi un système modulaire pouvant s'adapter à plusieurs types de cellules.

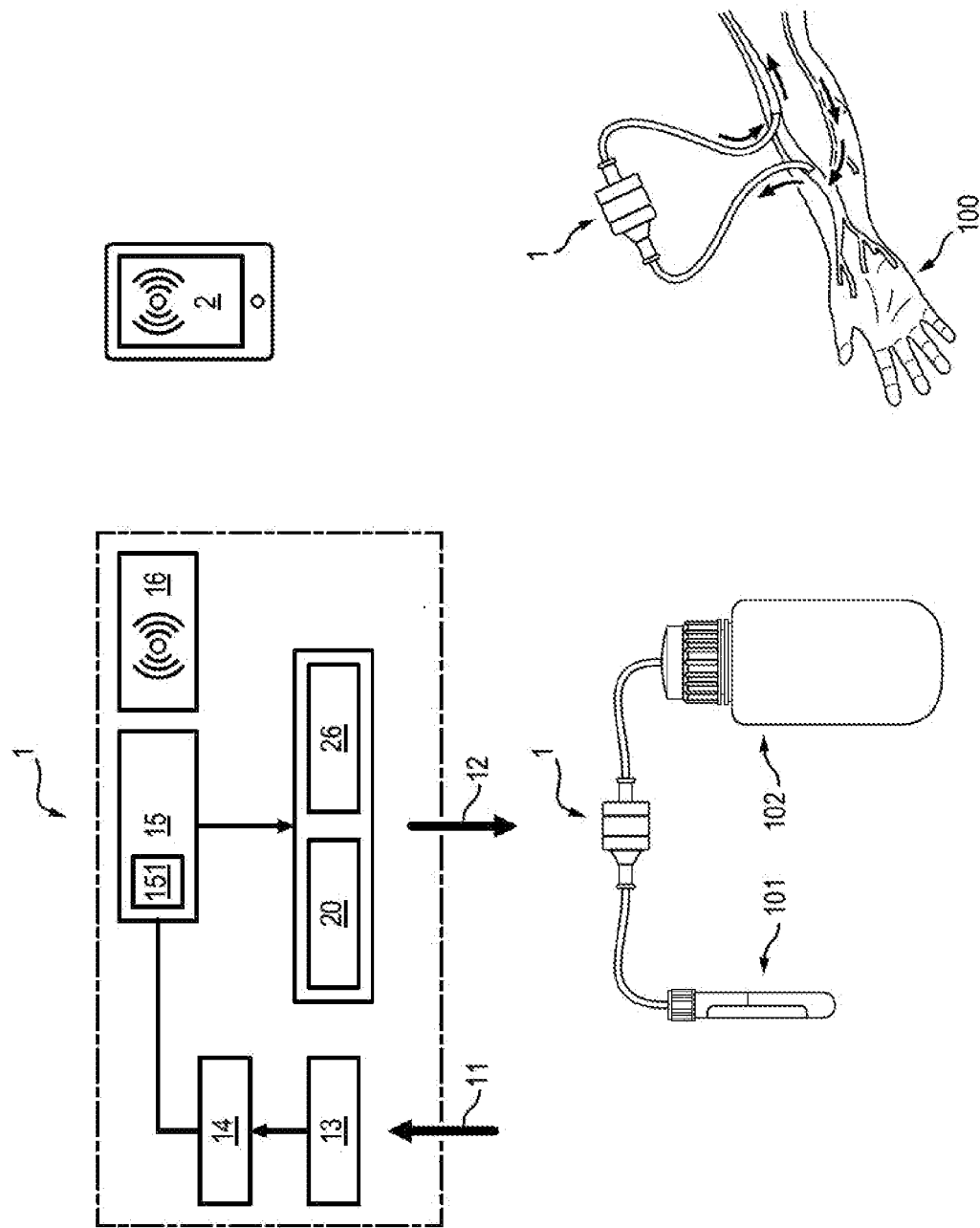
Revendications

- [Revendication 1] Système de détection d'au moins une espèce présente dans un fluide de préférence d'au moins une cellule circulante ou d'agrégat de cellules présent(e)(s) dans un fluide biologique humain ou animal et notamment de cellules tumorales circulantes (CTC) présentes dans un fluide sanguin, le système de détection comprenant des moyens de filtration (20) dudit fluide, lesdits moyens de filtration (20) comprenant une membrane filtrante, ladite membrane filtrante comprenant au moins un pore (22) adapté pour retenir une espèce d'un type donné présente dans le fluide, lesdits moyens de filtration (20) comprenant en outre au moins une ouverture (23) adaptée pour assurer, en fonctionnement au sein du fluide, une continuité de circulation du fluide biologique même lorsque ledit au moins un pore (22) est occupé.
- [Revendication 2] Système selon la revendication 1, comprenant en outre une pluralité d'électrodes (26) disposées autour dudit au moins un pore (22), lesdites électrodes formant un ou plusieurs circuits électriques dont les impédances sont aptes à varier dès lors qu'une ou des cellules se logent dans ou à proximité d'un pore (22).
- [Revendication 3] Système selon la revendication précédente, comprenant en outre une inductance (151) connectée aux électrodes de manière à former un circuit résonateur électromagnétique, les électrodes et l'inductance formant un circuit de détection, de préférence interrogeable à distance, de la présence de cellules piégées.
- [Revendication 4] Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la membrane filtrante (21) est en matériau choisi dans un groupe comprenant du verre ou du métal, par exemple du Nickel ou de l'Or) ou polymère, matériau ferromagnétique, matériau magnétique, par exemple NiFe, ou la combinaison de verre et de Silicium ou de Nickel et de Silicium, Nitrure de Silicium, Silicium ou plus généralement d'un matériau biocompatible et non toxique.
- [Revendication 5] Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel
- les pores (22) présentent une dimension transversale comprise entre 0,1 μm et 100 μm , de préférence entre 8 μm et 12 μm ou entre 8 μm et 15 μm ; et/ou
 - les pores (22) sont espacés d'un intervalle compris entre 100 nm et 100 μm ;
 - le nombre de pores (22) est compris entre 100 et 100 000 000.

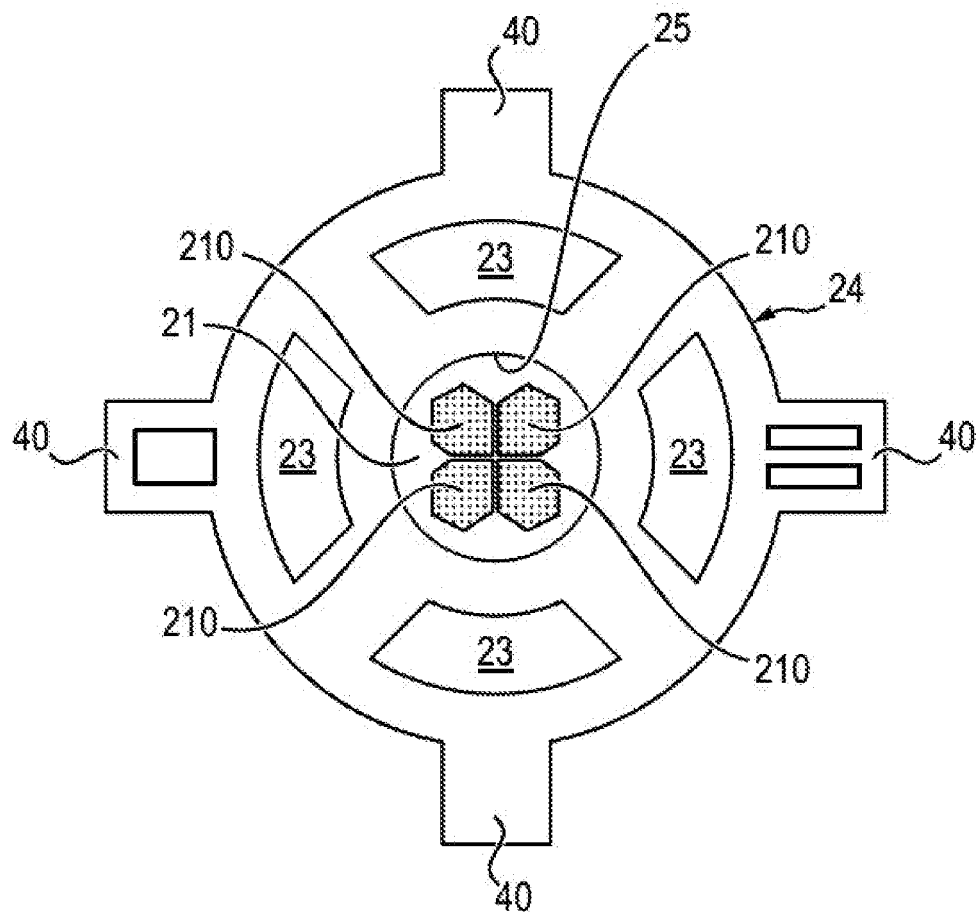
- [Revendication 6] Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel les pores (22) sont sensiblement circulaire ou sensiblement ovale ou sensiblement polygonale ou prennent la forme d'une fente, lesdites pores étant de préférence circulaire.
- [Revendication 7] Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel les pores (22) de la membrane sont arrangés par groupe de plusieurs pores, chaque groupe présentant un motif, les groupes pouvant être reliés entre eux via une rangée de pores.
- [Revendication 8] Système selon la revendication précédente, dans lequel le motif formé par un groupe présente une forme : hexagonale, circulaire.
- [Revendication 9] Système selon l'une des revendications 7 à 8, dans lequel la membrane (21) comprend plusieurs groupes de pores arrangés selon une structure en carré ou en forme d'étoile.
- [Revendication 10] Système selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel les pores (22) de la membrane sont arrangés de manière aléatoire.
- [Revendication 11] Système selon l'une des revendications précédentes, dans lequel les moyens de filtration (20) comprennent un support plan (24) comprenant une zone évidée où se situe la membrane filtrante (21) et dans lequel ladite ouverture (23) est formée, ladite ouverture étant disposée en périphérie de la membrane filtrante (21).
- [Revendication 12] Ensemble de capture comprenant une pluralité de systèmes selon l'une des revendications précédentes disposés en série, chaque système comprenant des moyens de filtration adaptés pour retenir un type d'espèce.
- [Revendication 13] Ensemble selon la revendication 12, comprenant un module d'entrée, un module de sortie, et au moins un module intermédiaire disposé entre le module d'entrée et le module de sortie, le module intermédiaire et le module de sortie supportant des moyens de filtration, les dits modules comprenant des moyens de fixation entre eux.
- [Revendication 14] Ensemble selon l'une des revendications 12 à 13, dans lequel le module d'entrée comprend une entrée du fluide et le module de sortie comprend une sortie du fluide.

[Fig. 1]

FIG. 1

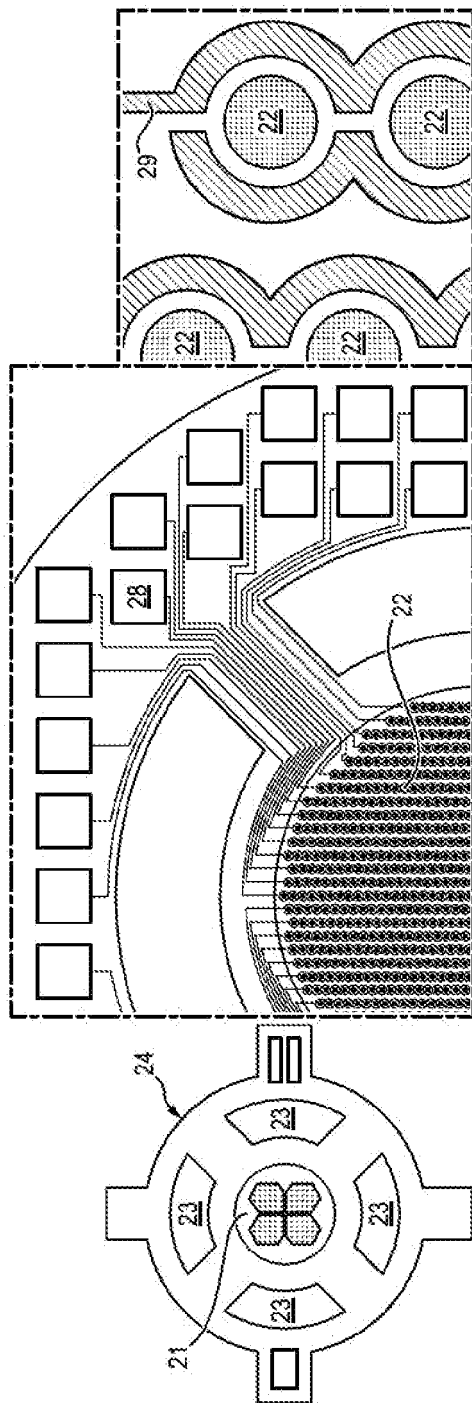


[Fig. 2]

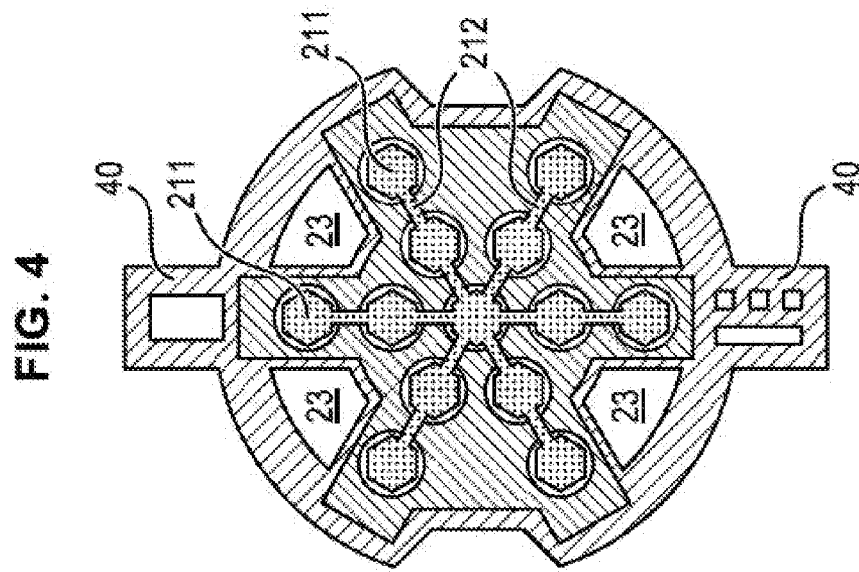
FIG. 2

[Fig. 3]

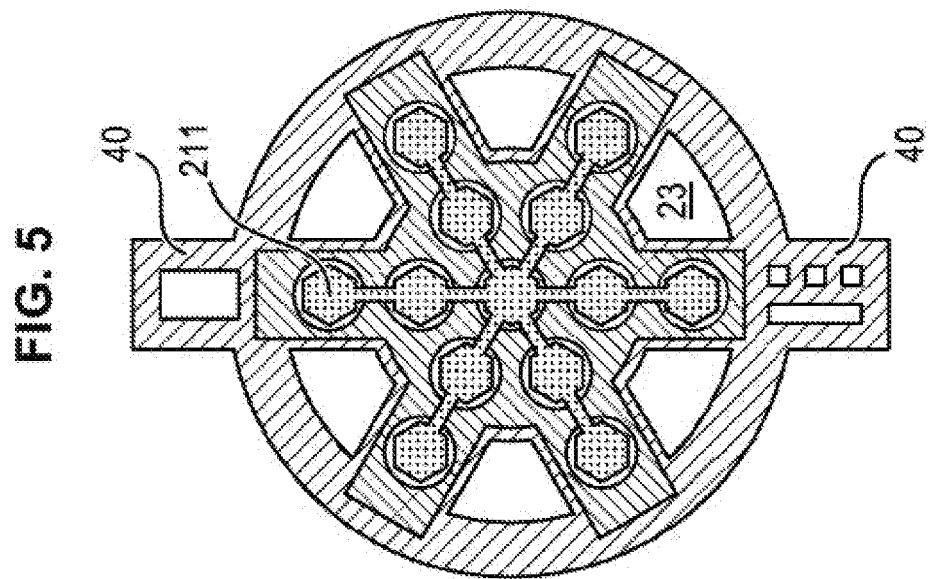
FIG. 3



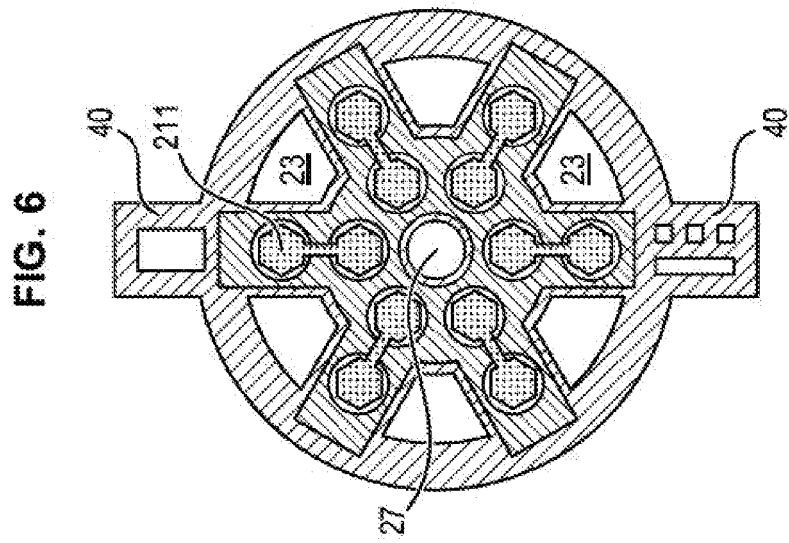
[Fig. 4]



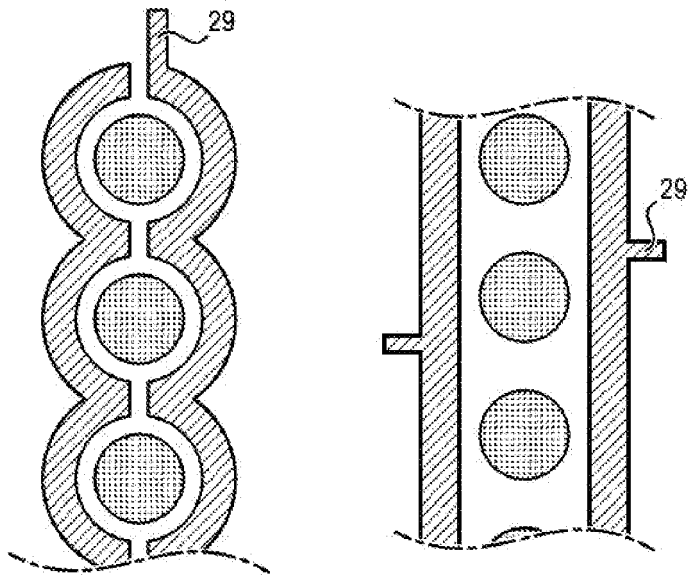
[Fig. 5]



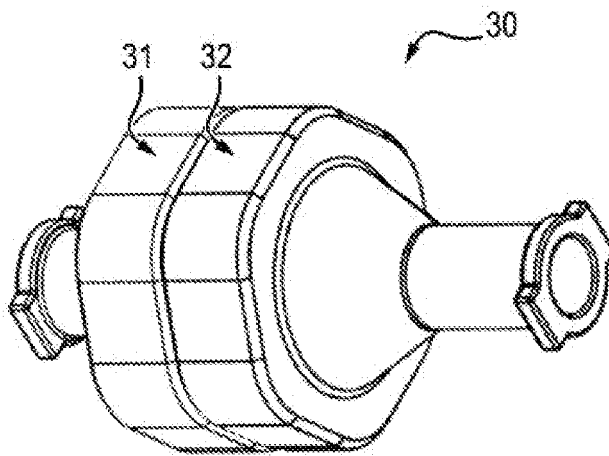
[Fig. 6]



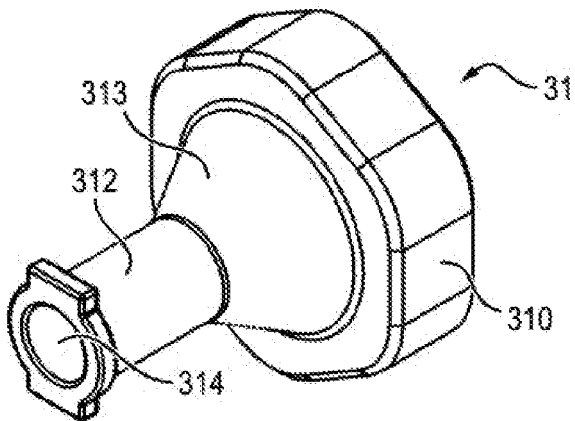
[Fig. 7]

FIG. 7

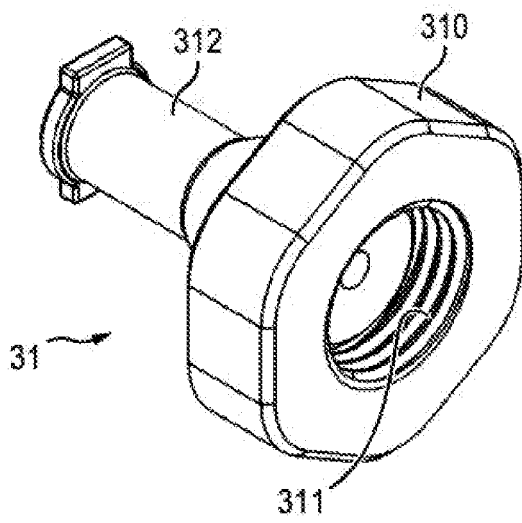
[Fig. 8]

FIG. 8

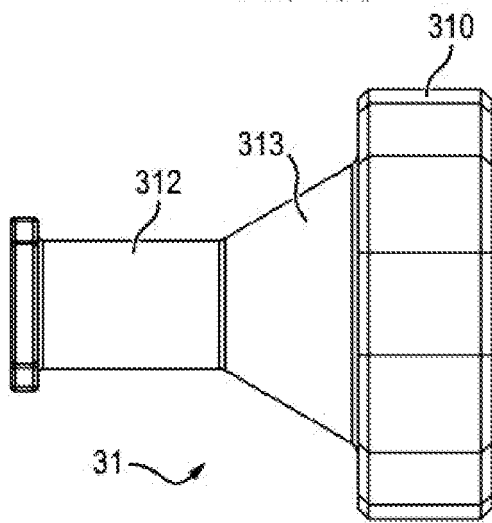
[Fig. 9a]

FIG. 9a

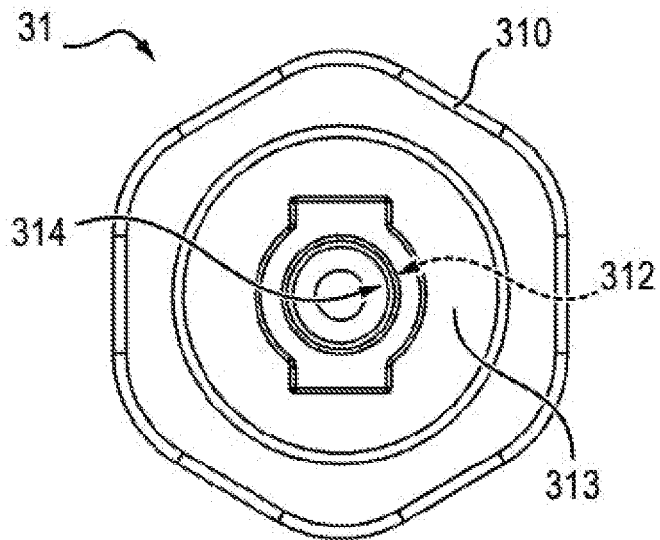
[Fig. 9b]

FIG. 9b

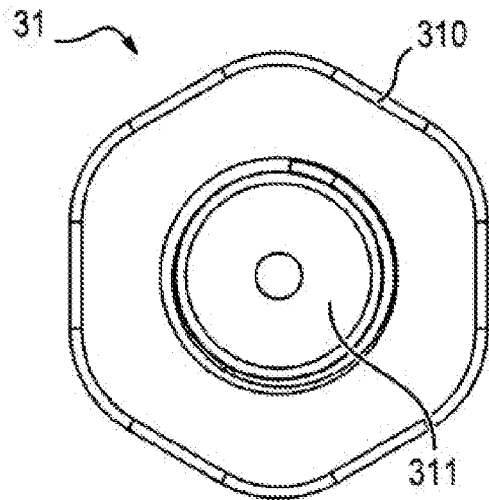
[Fig. 9c]

FIG. 9c

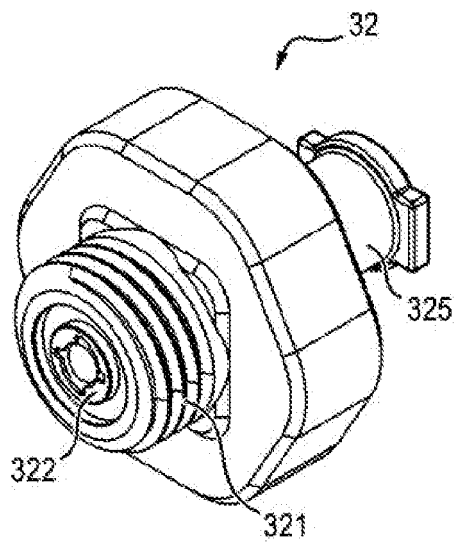
[Fig. 9d]

FIG. 9d

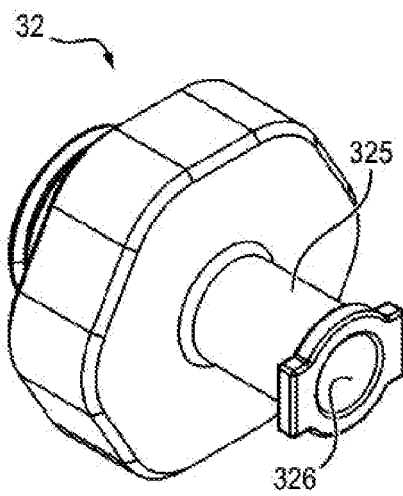
[Fig. 9e]

FIG. 9e

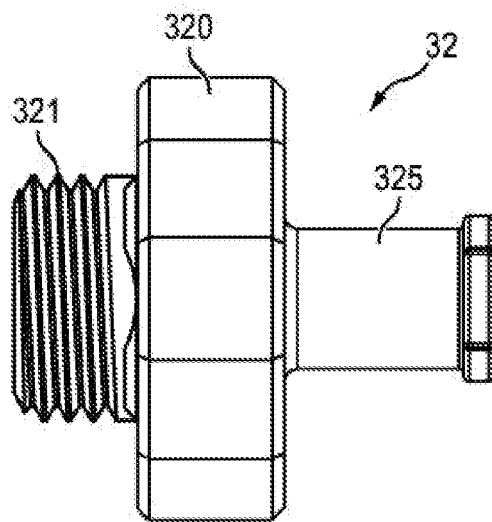
[Fig. 10a]

FIG. 10a

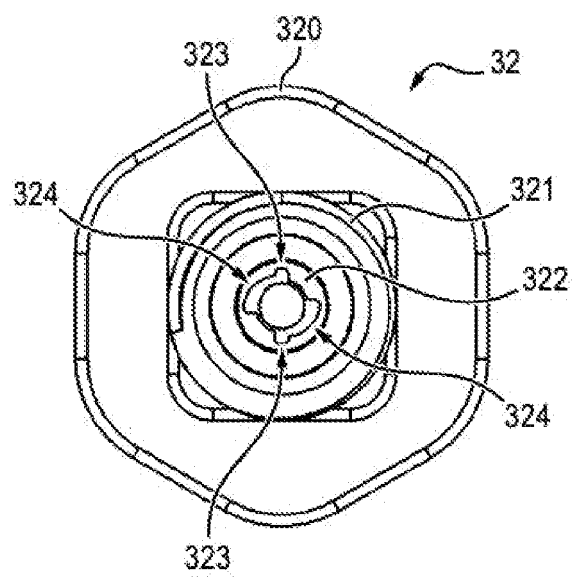
[Fig. 10b]

FIG. 10b

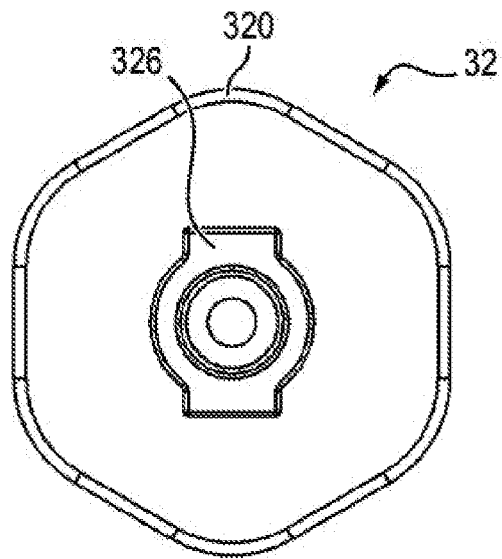
[Fig. 10c]

FIG. 10c

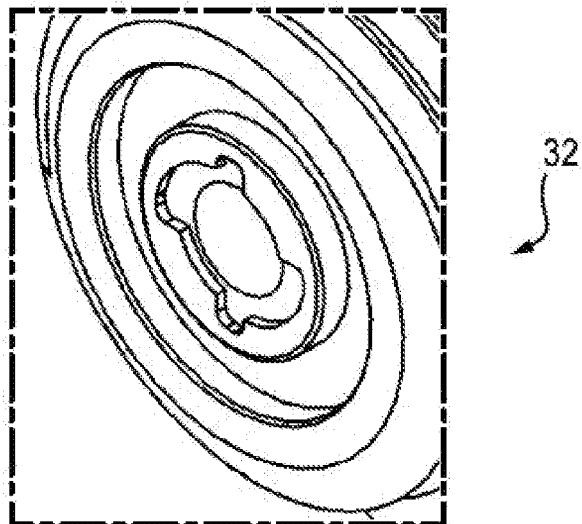
[Fig. 10d]

FIG. 10d

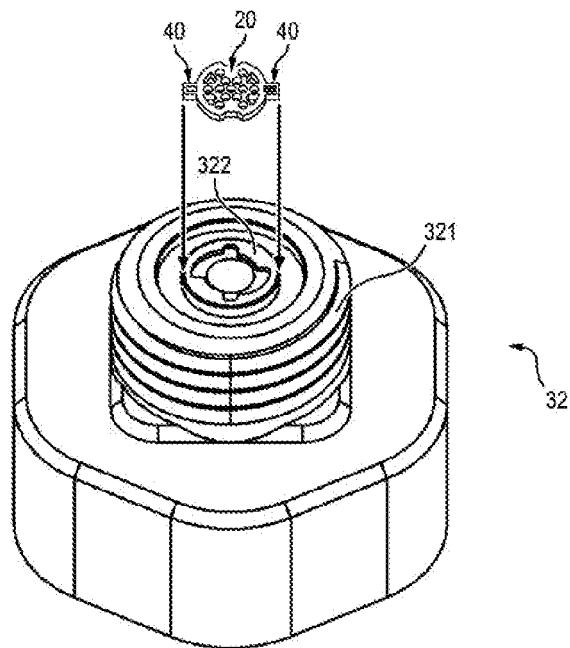
[Fig. 10e]

FIG. 10e

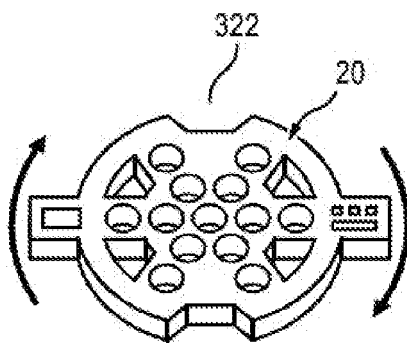
[Fig. 10f]

FIG. 10f

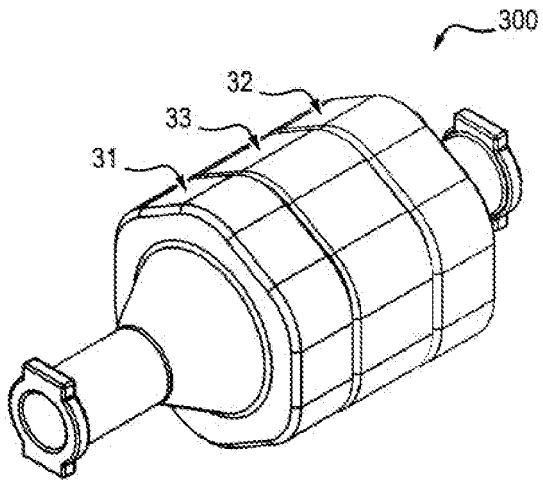
[Fig. 11a]

FIG. 11a

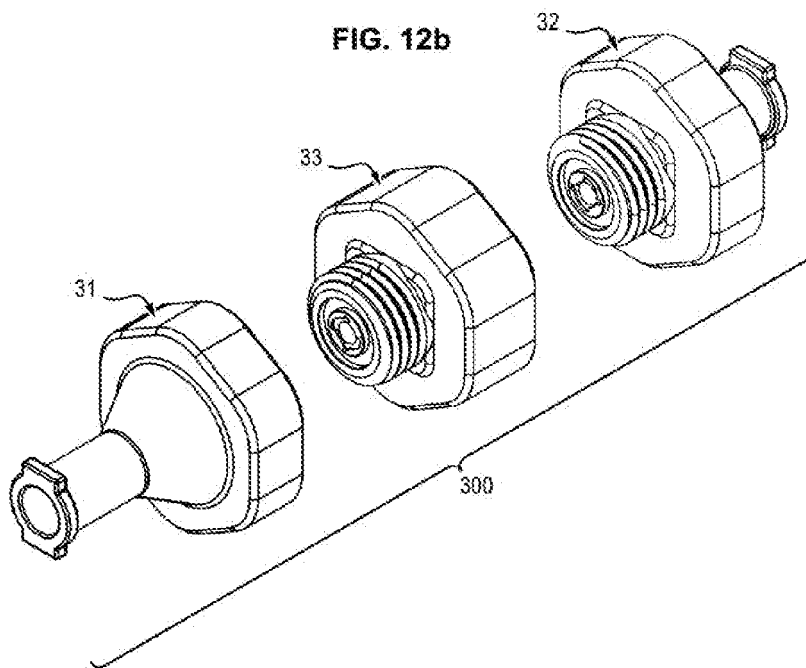
[Fig. 11b]

FIG. 11b

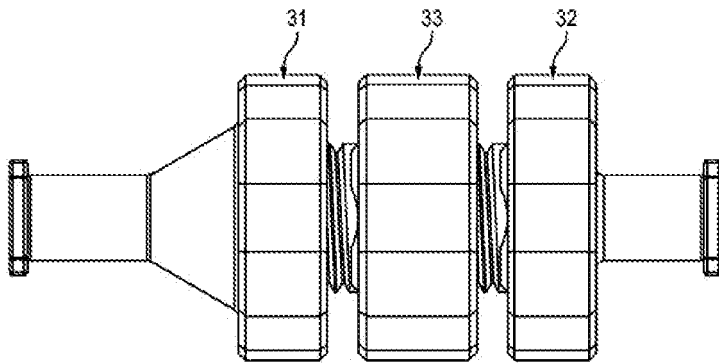
[Fig. 12a]

FIG. 12a

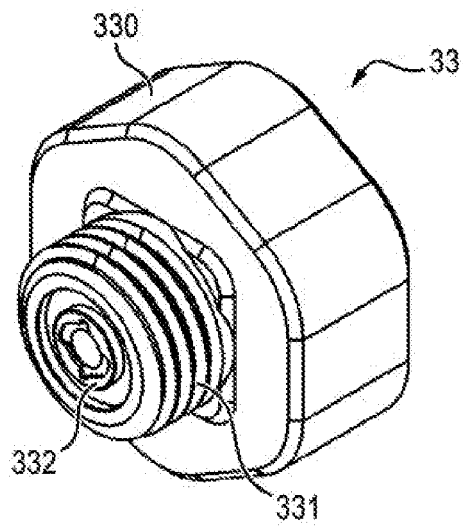
[Fig. 12b]

FIG. 12b

[Fig. 12c]

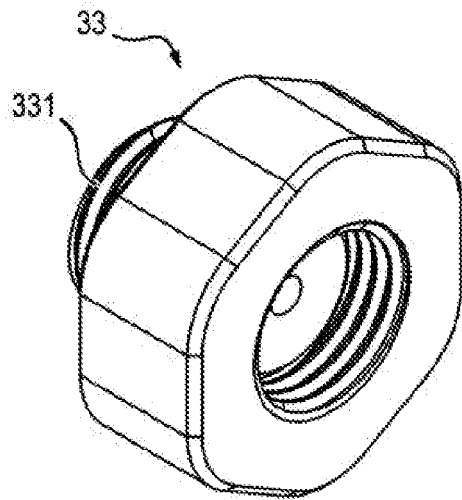
FIG. 12c

[Fig. 13a]

FIG. 13a

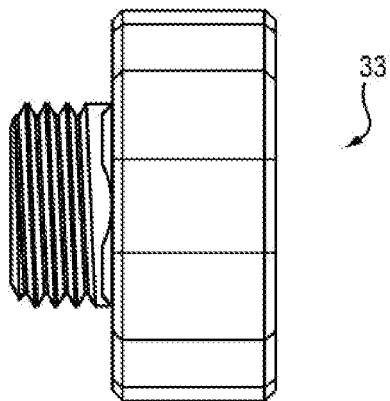
[Fig. 13b]

FIG. 13b

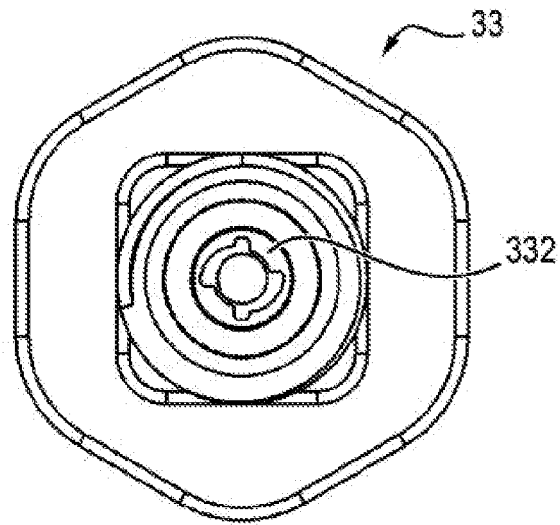


[Fig. 13c]

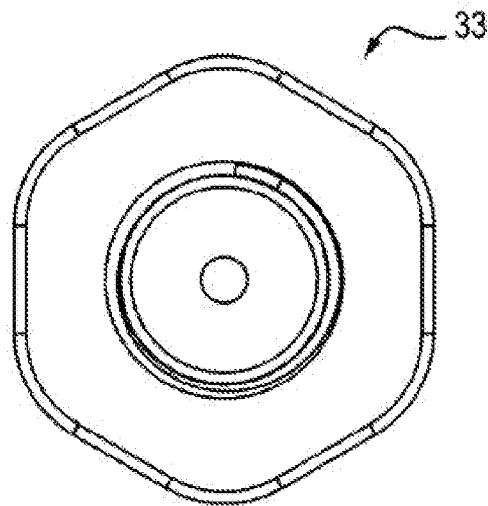
FIG. 13c



[Fig. 13d]

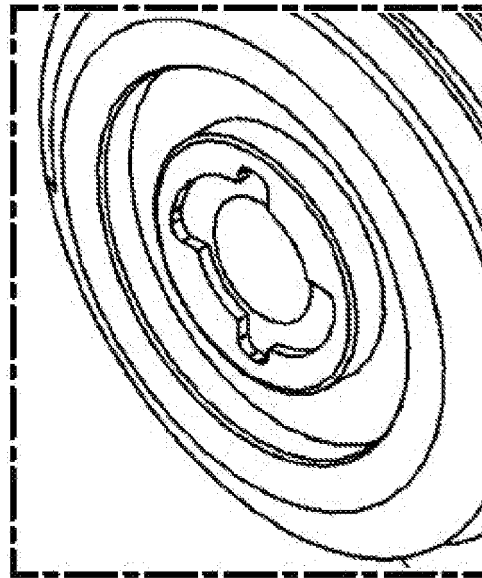
FIG. 13d

[Fig. 13e]

FIG. 13e

[Fig. 13f]

FIG. 13f



33

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 878027
FR 1912912

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	Alejandro Kayum Jimenez Zenteno: "Engineered micro-devices for the isolation of circulating tumor cells in clinical routine", 21 septembre 2018 (2018-09-21), XP055729508, Extrait de l'Internet: URL:https://hal.laas.fr/tel-02137588/docum ent [extrait le 2020-09-10]	1,4-14	G01N33/483 G01N27/00
Y	* page 124 - page 130; figures 3.13, 3.18-3.21; tableau 2.1 *	2,3	
Y	DE 10 2014 209193 A1 (BOSCH GMBH ROBERT [DE]) 19 novembre 2015 (2015-11-19) * abrégé; revendication 2 *	2,3	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			G01N B01L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
10 septembre 2020		Steinmetz, Johannes	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1912912 FA 878027

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 102014209193 A1	19-11-2015	DE 102014209193 A1	19-11-2015
		WO 2015172992 A1	19-11-2015